

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-278620

(43)Date of publication of application : 28.10.1997

(51)Int.Cl.

A01N 63/00

(21)Application number : 08-088323

(71)Applicant : IDEMITSU KOSAN CO LTD

(22)Date of filing : 10.04.1996

(72)Inventor : MOCHIZUKI MASAMI
MATSUNAKA HIROSHI
HIRAMATSU YOSHIYUKI

(54) CONTROL OF SOIL DISEASE INJURY OF PLANT

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To control the soil disease injury of Solanaceae plants, esp. wilt disease, by forcibly transducing bacteria as a specific nonpathogenic variant produced by mutation into a plant tissue to set the bacterial in the tissue.

SOLUTION: One kind of bacterium selected from *Pseudomonas fluopresens* (e.g. *Pseudomonas fluoresces*: FERM P-15063) and *Pseudomonas putida* (e.g. *Pseudomonas putida*: FERM P-15064) is forcibly transduced into a plant tissue and set in the tissue (for example, direct injection into the tissue using a relevant equipment, insertion of an equipment with sharp tip stuck with the bacterial into the plant body, scratching the plant bud or lead with a bacteria-adhered cutting equipment). According to this controlling method, soil disease injury can be controlled effectively at the time of needing the control, esp. even after setting the plant, therefore enabling the soil disease injury to be controlled continuously.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

02.04.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-278620

(43) 公開日 平成9年(1997)10月28日

(51) Int.Cl.⁵

A 0 1 N 63/00

識別記号

庁内整理番号

F I

A 0 1 N 63/00

技術表示箇所

F

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平8-88323

(22) 出願日 平成8年(1996)4月10日

(71) 出願人 000183646

出光興産株式会社

東京都千代田区丸の内3丁目1番1号

(72) 発明者 望月 正己

千葉県袖ヶ浦市上泉1280番地出光興産株式会社内

(72) 発明者 松中 洋

千葉県袖ヶ浦市上泉1280番地出光興産株式会社内

(72) 発明者 平松 嘉行

千葉県袖ヶ浦市上泉1280番地出光興産株式会社内

(74) 代理人 弁理士 遠山 勉 (外2名)

(54) 【発明の名称】 植物の土壤病害防除方法

(57) 【要約】

【課題】 ナス科の植物の栽培において、植物の各生育段階における必要な時期にいつでも、植物の組織内部にシュードモナス属細菌を効率的に定着させることを可能とし、土壤病害、特に青枯病を継続して防除することが可能な土壤病害の防除方法を提供する。

【解決手段】 シュードモナス属細菌を用いた植物の土壤病害防除方法において、シュードモナス フルオレセンス (*Pseudomonas fluorescens*) 及びシュードモナス

プチダ (*Pseudomonas putida*) から選択される細菌をナス科植物の植物組織内に強制的に導入し前記細菌を植物組織内に定着させることによって、ナス科植物の土壤病害を防除する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 シュードモナス フルオレセンス (*Pseudomonas fluorescens*) 及びシュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) から選択される細菌を植物組織内に強制的に導入することによって、前記細菌を植物組織内に定着させることを特徴とするナス科植物の土壤病害防除方法。

【請求項2】 細菌を植物組織内に強制的に導入する方法が、注入器具を用いた植物組織内への細菌の直接注入；細菌を付着させた先端の尖った器具の植物体への挿入；細菌を付着させた切断器具を用いた芽かき、葉かき、又は茎、葉、根の引っかき；捻枝、根切り、芽かき又は葉かきによる傷口への細菌の付着；から選ばれる請求項1記載の土壤病害防除方法。

【請求項3】 シュードモナス フルオレセンスがシュードモナス フルオレセンス FERM P-15063であることを特徴とする請求項1記載の土壤病害防除方法。

【請求項4】 シュードモナス プチダがシュードモナス プチダ FERM P-15064であることを特徴とする請求項1記載の土壤病害防除方法。

【請求項5】 土壤病害が青枯病である請求項1記載の土壤病害防除方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】 本発明は植物の土壤病害防除方法に関し、詳しくは、シュードモナス属細菌を植物組織内に強制的に導入し定着させることによってナス科植物の土壤病害、特に青枯病を効率的かつ継続的に防除する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 農作物等の植物の栽培において、土壤中に存在する病原菌によって引き起こされる土壤伝染性病害を防除する技術の開発に関して現場からの強い要望があるにもかかわらず、有効で実用的な土壤伝染性病害の防除手段は得られていないのが現状である。

【0003】 例えば、土壤伝染性病害に対する防除手段としては、従来から、殺菌剤、燻蒸剤などの薬剤や蒸気、太陽熱などを利用した土壤消毒が行われてきた。しかし、このような土壤消毒による殺菌法では、土壤中に存在する病原菌は勿論のこと植物の生育にとって有用な微生物までも殺菌してしまうことから、土壤中の生態系を大きく変化させ土壤病害菌の新たな発生を助長して病害を激発させてしまう場合さえある。

【0004】 また、これ以外の土壤病害防除手段として、栽培植物に抵抗性を付与するために品種改良や接ぎ木などの栽培技術改良が行われており、これらの技術を利用した土壤病害防除方法が普及している。しかし、このような抵抗性植物をも犯しうる新しい土壤病原菌のレースの出現などによりこれらの方法による土壤病害防除効

果は継続性が期待できないなど、その利用には限界が指摘されている。

【0005】 この様に、植物の土壤病害防除に関して多くの研究や開発が行われているにも係わらず、実用段階においては土壤病害に対して十分な効果をあげるまでに至っていない。さらに、最近の野菜栽培では、施設栽培の普及や生産地の指定化にともなって単一作物栽培や連作栽培が増加する傾向にあり、このような状況のなかで土壤病害や連作障害が深刻化してきている。

【0006】 一方、農業分野での有用微生物の利用について、近年、多くの研究や報告がなされており、これらの有用微生物を利用した微生物資材の開発も試みられている。これらの多くは、土壤病害の生物的防除に関するものであるが、特に、有用微生物の土壤病害に対する拮抗性能は植物の土壤病害防除において重要な役割を担うと考えられており、この拮抗作用のメカニズムに関する研究が盛んに行われている。

【0007】 植物体内へのシュードモナス属細菌の導入方法に関してはいくつかの報告があり、例えば、植物の根を微生物懸濁液に浸漬する方法（特開昭63-246306号公報）、根元に微生物懸濁液を灌注する方法（特表平3-504322号公報）、苗を微生物懸濁液に浸漬する方法（特開平1-16579号公報、特開昭60-186230号公報）等が知られている。しかし、これらの導入方法は、植物に病原性を有するシュードモナス属細菌が元々植物に感染する能力を持つことを利用したものであり、用いられているシュードモナス属細菌は、病原性を有するシュードモナス属細菌から突然変異により病原性を失わせることによって作製した非病原性変異株であり、容易に植物組織内部に入り込むことができる。

【0008】 これに対し、病原性を持たないシュードモナス属細菌を強制的に植物内部に導入する方法としては、双子葉植物において生育が稚苗の段階では未分化組織である胚軸を切断しその切断面より微生物を接種すると微生物を取り込むことができる性質を利用してシュードモナス属細菌に感染させる方法（特開平5-70316号公報）が知られている。

【0009】 さらに、シュードモナス属細菌の中でも、蛍光性を有する細菌が土壤病原菌に対する拮抗作用が高いとされており、植物根と共生培養することによって植物への感染能を高めた蛍光性細菌を、種子コートもしくは播種床の培土に混合して育苗することにより、植物根内部に導入すなわち感染させてその拮抗性能を利用し、土壤病害を防除する方法（特開平7-163334号公報）が知られている。

【0010】 カーネーションでは、茎葉部もしくは根部をシュードモナス フルオレセンス P-4株菌の懸濁液に浸漬させることによる土壤病害の防除方法（特開平2-211861号公報）が知られている。

【0011】しかし、これらのシュードモナス属細菌を用いた土壌病害の防除方法では、方法によっては膨大な量のシュードモナス属細菌が必要であったり、あるいは、土壌にシュードモナス属細菌を施用する方法では土壌中で土着菌との拮抗作用により施用したシュードモナス属細菌が死滅することがあるなどシュードモナス属細菌を必ずしも効率的に作用させていない点で問題があった。さらに、これらの技術は何れも農作物等の栽培植物の定植時あるいはそれ以前についてのシュードモナス属細菌処理に関するものであり、植物の生育段階において特定されない時期に、特に、植物を定植した後に防御のためのシュードモナス属細菌の追加施用ができないなどの点で問題があった。

【0012】一方、トマトの茎に非病原性フザリウム オキシスポラムやアースロバクター s p. を針接種することでそれぞれ萎ちょう病や青枯病を防除する方法（日本植物病理学会創立 80 周年記念大会、平成 7 年 4 月 2 日）、クラビバクター キシリ サブスピーズ シノドンシスをトマトの茎に針接種することで萎ちょう病を防除する方法（特表平 4-504722 号公報）、アウレオバクテリウム（Aureobacterium）属、バチルス（Bacillus）属、フィロバクテリウム（Phyllobacterium）属、シュードモナス（Pseudomonas）属細菌を、綿の茎に針接種することでフザリウム病害を防除する方法（Biological Control 5, 83-91 (1995)）が知られているが、シュードモナス属細菌において土壌病害を防除する目的で針接種のような植物組織内への直接的導入方法がナス科植物に対して試みられたという報告はない。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】以上のように、従来の土壌病害防除方法はそれぞれに問題点があり、満足できるものではなかった。特に、トマト、ナス、ピーマン等のナス科植物では定植後にも土壌病害の一つである青枯病により多大な被害を被ることがあり、青枯病を継続的に防除する方法が強く求められていた。

【0014】本発明は上記観点からなされたものであり、ナス科の植物の栽培において、植物の各生育段階における必要な時期にいつでも、植物の組織内部にシュードモナス属細菌を効率的に定着させることを可能とし、土壌病害、特に青枯病を継続して防除することが可能な土壌病害の防除方法を提供することを課題とする。

【0015】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、植物の生育段階にとらわれず必要な時期に特定のシュードモナス属細菌を植物組織内に強制的に導入してこれを定着させることによって、ナス科植物の土壌病害を効率的かつ継続的に防除できることを見出し本発明を完成させた。

【0016】すなわち本発明は、シュードモナス フルオレセンス及びシュードモナス プチダから選択される

細菌を植物組織内に強制的に導入することによって、前記細菌を植物組織内に定着させることを特徴とするナス科植物の土壌病害防除方法である。

【0017】本発明の土壌病害防除方法において、上記シュードモナス属細菌を植物組織内に導入する方法として、具体的には、注入器具を用いた植物組織内への細菌の直接注入；細菌を付着させた先端の尖った器具の植物体への挿入；細菌を付着させた切断器具を用いた芽かき、葉かき、又は茎、葉、根の引っかき；捻枝、根切り、芽かき又は葉かきによる傷口への細菌の付着；等の方法を挙げることができる。

【0018】本発明の土壌病害防除方法に用いられるシュードモナス属細菌のうちシュードモナス フルオレセンスについて具体的には、シュードモナス フルオレセンス FERM P-15063 等が挙げられ、また、シュードモナス プチダについて具体的には、シュードモナス プチダ FERM P-15064 等が挙げられる。

【0019】本発明のナス科植物の土壌病害防除方法を用いて有効に防除できる土壌病害としては青枯病等を挙げることができる。この様な、本発明のナス科植物の土壌病害防除方法によれば、ナス科植物の組織内部に導入された上記シュードモナス属細菌が植物組織内に確実性をもって効率よく定着することにより、土壌病害の病原菌から前記植物を効果的に保護することが可能となる。また、本発明のナス科植物の土壌病害防除方法によれば、土壌病害を必要な時期に、特に定植後にも効率的に防除することができるので、土壌病害を継続的に防除することが可能となる。

【0020】

【発明の実施の形態】以下に本発明の実施の形態を説明する。まず、はじめに本発明に用いるシュードモナス属細菌について説明する。

【0021】（1）本発明に用いるシュードモナス フルオレセンス及びシュードモナス プチダ

本発明に用いるシュードモナス フルオレセンス及びシュードモナス プチダはそれぞれ、シュードモナス フルオレセンス、シュードモナス プチダに同定されるシュードモナス属細菌であって、ナス科植物の組織内部に導入され定着することにより、土壌病害の病原菌より前記植物を保護する作用を有するものであれば、特に制限されるものではないが、シュードモナス フルオレセンスのうちでも好ましい菌株として、シュードモナス フルオレセンス FERM P-15063 を、また、シュードモナス プチダのうちでも好ましい菌株として、シュードモナス プチダ FERM P-15064 を例示することができる。

【0022】これら 2 つの菌株は、後述の実施例に示す様にしてそれぞれトマトの根より分離された菌株であって、菌学的、生理学的には以下の表 1～表 3 に示す性質

を有するものである。これらの菌学的、生理学的諸性質を、バージェイズ・マニュアル・オブ・システムティック・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1, [P.H.A.Sneath, N.S.Mair, M.E. Sharpe and J.G.Holt(1986)Williams & Wilkins]) に従って調べた結果、上記2つの菌株は、それぞれシュードモナス フルオレセンス、シュードモナス プチダに属する新規菌株であると同定された。また、これら菌株は、平成7年7月26日に通商産業省工業技術院生命工

学工業技術研究所(郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号)に、上記受託番号FERM P-15063、FERM P-15064として寄託されている。

【0023】なお、表2、表3中のNDは、その試験項目に関して試験を行わなかったことを示している。

【0024】

【表1】

表1. 菌学的性質

	シュートモナス フルオレ FERM P-15063	シュートモナス プチダ FERM P-15064
形態	桿 状	桿 状
グラム反応	—	—
胞子	—	—
運動性	+	+
コロニー形態*	正円形 クリーム状・黄色 半透明 凸 状 平 滑 光沢あり 直径2mm	正円形 クリーム状 半透明 凸 状 平 滑 光沢あり 直径3mm
生育の範囲	37℃ + 45℃ —	37℃ + 45℃ (+)
カタラーゼ	+	+
オキシダーゼ	+	+
嫌氣的グルコースOFテスト	—	—

【0025】*:コロニー形態は、YPA培地(1Lの脱イオン水にイーストエキス5g、ペプトン10g、寒天15gを添加し、pHを7に調整して作製)を用いて30℃で得られたコロニーの形態を観察したものであ

る。

【0026】

【表2】

表2. 生理学的性質1*

試 験 項 目	シュート・モナス フルオレンス FERM P-15063	シュート・モナス プチ FERM P-15064
硝酸塩の還元	+	-
インドールの産生	-	-
グルコースからの酸生成	-	(+)
アルギニン加水分解	-	+
ウレアーゼ	-	-
エスクリン加水分解	-	-
ゼラチン加水分解	+	-
β -ガラクトシダーゼ	-	-
グルコースの利用	+	+
アラビノースの利用	+	+
マンノースの利用	+	+
マンニトールの利用	+	-
N-アセチルグルコサミンの利用	+	-
マルトースの利用	-	-
グルコン酸の利用	+	+
カプリン酸の利用	+	+
アジピン酸の利用	-	-
リンゴ酸の利用	+	+
クエン酸の利用	+	+
フェニルアセテートの利用	-	+
チトクロムオキシダーゼ	+	+
残余硝酸	ND	+

【0027】*：生理学的性質1の試験はAPI社の微生物同定キットを用いて行い、試験条件は30℃、48時間であった。

【0028】

【表3】

表3. 生理学的性質2^{*1}

試 験 項 目	シュート・モナス フルオレンス FERM P-15063	シュート・モナス プチ FERM P-15064
蛍光色素	-	+
グルコースからの酸生成 (PWS ^{*2})	-	+
嫌氣的グルコースOFテスト	-	-
好氣的グルコースOFテスト	+	+
マルトースOFテスト	-	-
アルギニンの加水分解	+	ND
レシチナーゼ	-	ND
ツイーン80	-	ND
レバン	-	ND
ベンジルアミンの利用	ND	+

【0029】*1：生理学的性質2の試験はAPI社の微生物同定キットを用いて行い、試験条件は30℃、7日間であった。

*2：PWSはペプトンシュクロース水を表す。

【0030】これら新規菌株も含めた本発明に用いるシュードモナス フルオレセンス、シュードモナス プチ

ダの培養は、通常の培養方法に準じて行えばよい。培養に用いる培地は、例えば、イーストエキス・ペプトン培地、ジャガイモ半合成培地等シュードモナス属細菌の培養が可能な培地を用いる。培養条件も、上記シュードモナス属細菌の培養が可能であれば特に制限されず、通常、温度10～38℃で、好気性条件下で培養は行われる。

【0031】(2) 本発明のナス科植物の土壤病害防除方法

本発明の土壤病害防除方法は、上記シュードモナス フルオレンセス及びシュードモナス プチダから選ばれるシュードモナス属細菌をナス科植物の植物組織内に強制的に導入することによって、前記細菌を植物組織内に効率よく定着させることでナス科植物の土壤病害を防除することを特徴とする。

【0032】本発明のナス科植物の土壤病害防除方法において、上記シュードモナス属細菌を植物組織内に強制的に導入するとは、植物の根や茎葉の表面等からの吸収の様に植物が行う生理作用を利用して上記シュードモナス属細菌を植物組織内に導入するのとは異なり、これを植物組織内に直接的に導入することをいう。本発明において、シュードモナス属細菌をナス科植物の植物組織内に強制的に導入する方法であるが、上記シュードモナス属細菌の少なくとも1種を植物組織内に直接的に導入することができる方法であれば特に制限されるものではない。

【0033】具体的には、注射器等の注入器具を用いて上記シュードモナス属細菌を植物組織内に直接注入する方法、針（注射針、裁縫用の針等）やピン、爪楊枝の様に先端の尖った器具に上記シュードモナス属細菌を付着させてこれを植物に挿入する方法、ハサミやナイフ等の切断器具に上記シュードモナス属細菌を付着させこれを用いて芽かき、葉かき等を行う、あるいは、これを用いて茎、葉、根等を引っかく方法、手作業や切断器具を用いた捻枝、根切り、芽かき、葉かき等によりできた傷口へ上記シュードモナス属細菌を付着させる方法等の方法を挙げることができる。

【0034】また、植物体の傷口へシュードモナス属細菌を付着させる方法としては、刷毛、筆、ヘラ等による塗布等の一般的な付着方法の他に、霧吹きや噴霧機等を用いた噴霧、あるいは浸漬等を挙げることができる。ここで、上記シュードモナス属細菌を植物組織内に強制的に導入する際に用いる、注入器具、先端の尖った器具、切断器具、付着のための器具等は、シュードモナス属細菌の菌体またはその菌体を含む菌体懸濁液等を上述した様なそれぞれの方法により植物組織内に導入することが可能な器具であればよく、上記に例示した各器具に制限されるものではない。

【0035】本発明の方法において、ナス科植物の植物組織内に導入するシュードモナス属細菌については、上

記(1)の様にして培養したシュードモナス属細菌を、培養物の状態でそのまま植物体に導入することも可能であるが、濾過、遠心分離等により培養物よりシュードモナス属細菌を取り出してこれを植物に導入することが好ましい。また、必要に応じて前記培養物や培養物から取り出された菌体を適当な担体等と混合して微生物資材とし、これを本発明の方法に用いることも可能である。担体としては、通常微生物資材に用いられる有機質の素材または無機質の素材を用いることができる。さらに、通常微生物資材に用いられる他の成分を適宜配合してもよい。微生物資材に含ませるシュードモナス属細菌は、単独でも、2種以上の混合物であってもよい。微生物資材の剤型、調製方法は特に制限されない。

【0036】微生物資材中のシュードモナス属細菌の含有量は、特に制限されないが、微生物資材を用いてナス科植物の植物組織内にシュードモナス属細菌を導入する際に、菌体濃度が好ましくは $10^5 \sim 10^{12}$ cfu/ml、より好ましくは $10^6 \sim 10^{10}$ cfu/mlの範囲の菌体懸濁液を調製することができるものであることが望ましい。なお、「cfu」は、コロニー形成単位（菌体懸濁液の希釈液を寒天培地にまいたときに形成されるコロニー数）を示す。

【0037】また、本発明の土壤病害防除方法においてナス科植物に導入されるシュードモナス属細菌の量は、1回当たり $10^1 \sim 10^{10}$ cfu/個体の範囲であることが好ましく、 $10^2 \sim 10^8$ cfu/個体がより好ましい範囲である。植物体の傷口をシュードモナス属細菌に浸漬する場合、所定の濃度の菌体懸濁液に1秒～12時間、好ましくは30秒～10時間、さらに好ましくは1分～5時間浸漬することにより所望の量の菌体が植物組織内部に導入されることになる。

【0038】導入の時期については、育苗期、定植期、収穫期等のいずれの時期にも導入することが可能であり、導入回数は1回に限らず数回にわたってもよい。また、導入箇所については、茎の基部、上部や葉柄等が挙げられるが、育苗期に子葉下の茎に導入すればより効果的に土壤病害を防除することが可能となり好ましい。

【0039】ここで、上記シュードモナス属細菌をナス科植物の植物組織内に強制的に導入する処理のうち、根部組織について行われる処理については定植以前、特に定植時に行われる処理であり、定植後はもっぱら地上部組織について上記シュードモナス属細菌が強制的に導入される。

【0040】本発明の土壤病害防除方法が適用されるナス科植物としては、例えば、トマト、ナス、ピーマン等が挙げられる。また、本発明の方法により防除されるナス科植物の土壤病害のうちでも、より効果的に防除される土壤病害として、ナス科植物で問題となることが多い青枯病を挙げることができる。

【0041】

【実施例】以下に本発明の実施例を説明する。まず、実施例に用いたシュードモナス属細菌の取得例を説明する。

【0042】

【製造例】 シュードモナス属細菌の取得

温室で栽培中のトマトの根を掘り出しよく水洗した。水洗後、トマトの根を長さ約1cmに切断し滅菌済みの乳鉢に入れて殺菌水を加えてすりつぶして懸濁液を作製した。得られた懸濁液をYPA培地の表面に塗抹し、28℃で培養した。培養後、YPA培地の表面に形成された細菌コロニーのそれぞれから細菌を単離した。

【0043】トマト（品種名：桃太郎）の種子を培養土（プロ培土（みかど育種農場社製））の苗床に播種し発芽させた。本葉が2～3枚展開したところで、根に傷をつけるためトマト苗をビニールポットから取り出して根を水洗し培養土を落とした。このトマト苗について、上記操作により単離された細菌をそれぞれ殺菌水で 10^9 cfu/ml濃度になるよう調整した各懸濁液に、1菌株の懸濁液当たりトマト苗16本の割合でその根部を浸漬した後、培養土（クレハ園芸培土（呉羽化学社製））を詰めたプラスチックケースにケース当たり8本移植し、25℃以上に調節した温室で1週間育苗した。また、上記と同様にして根部を水洗したトマト苗の16本を、無処理のままプラスチックケースに移植し上記と同様に1週間育苗した。

【0044】移植の1週間後、上記全てのトマト苗の根にカッターナイフを差し込んで傷を付け、その直後に青枯病菌を 10^6 cfu/ml含む懸濁液をプラスチックケース当たり80mlずつ灌注した。その後、プラスチックケースを25℃以上に調節した温室に置き、トマト苗を3週間育苗したところで、トマト苗全てについて青枯病の発病状況を観察し、発病の程度を下記発病度の基準に従って5段階に判定した。また、得られた各トマト苗の発病度から、上記各細菌の菌株の処理区および無処理区について、下記の計算式に基づいてそれぞれ平均発病度（%）を求めた。

【0045】＜発病度の判定基準＞

- 0：無病
- 1：1/4発病
- 2：1/2発病
- 3：3/4発病
- 4：枯死

【0046】

【数1】平均発病度（%）= $100 \times (4 \times n_4 + 3 \times n_3 + 2 \times n_2 + 1 \times n_1) / 4 \times (n_4 + n_3 + n_2 + n_1 + n_0)$

n_4 ：発病度4の株数、 n_3 ：発病度3の株数、 n_2 ：発病度2の株数

n_1 ：発病度1の株数、 n_0 ：発病度0の株数

【0047】さらに、以下の計算式により上記各細菌の菌株について青枯病の防除価（%）をそれぞれ求め、こ

の防除価が60%以上を示す2菌株を選択した。

【0048】

【数2】防除価（%）= $100 \times (\text{無処理区の発病度} - \text{処理区の発病度}) / \text{無処理区の発病度}$

（但し、各区の発病度は平均発病度（%）である。）

【0049】上記で取得した2菌株の菌学的、生理学的性質を調べたところ、一方の菌株はシュードモナス プチダの新規菌株、もう一方の菌株はシュードモナス フルオレセンスの新規菌株であると判明した。これらがそれぞれ、シュードモナス プチダ FERM P-15064、シュードモナス フルオレセンス FERM P-15063である。

【0050】なお、上記で用いたYPA培地は、1Lの脱イオン水に、バクト・イーストエキス（ディフコ社製）5g、バクト・ペプトン（ディフコ社製）10g、ノーブル寒天（ディフコ社製）15gを加えて調製し、pH7に調整した培地であった。また、以下の実施例で用いたYPA培地も全て上記と同様にして調整された培地であった。

【0051】

【実施例1】 トマト青枯病の防除1

（1）シュードモナス属細菌の培養

上記製造例で得られたシュードモナス プチダ FERM P-15064をYPA培地に接種して28℃で、24時間の培養を行った。

【0052】（2）青枯病菌汚染土壌の作製

青枯病菌汚染土壌は、殺菌した栽培用培土（山土、腐葉土、鶏糞堆肥を容積比4：2：1で混合し調製）をプランター1個につき10Lずつ詰め、これに青枯病菌液を 10^6 cfu/ml（培土）となるように灌注して調製した。

【0053】（3）トマトの栽培

トマト（品種名：桃太郎）の種子を培養土（プロ培土）の苗床に播種し発芽させ、本葉が2～3枚展開した頃に培養土（クレハ園芸培土）を詰めたビニールポットに移植し、25℃以上に調製した温室において育苗した。

【0054】播種後、55日目に上記青枯病菌汚染土壌を詰めたプランター8個に、プランター1個当たり苗を5本ずつ定植した。そのうちプランター4個に定植された苗については、定植の7日前と2日前、及び、定植の7日後、14日後、21日後、28日後に、シュードモナス プチダ FERM P-15064の針接種を行った。針接種の方法は、上記で培養したシュードモナス プチダ FERM P-15064をYPA培地より注射針ですくい取り、トマト苗の茎の部分に直交するように菌体が付着している部分を2回挿入する方法であった。残りのプランター4個に定植された苗には、比較のためにシュードモナス属細菌の菌体を付着させていない注射針を上記と同様の時期に同様の方法で茎の部分に挿入した（比較例1）。なお、定植後も全てのプランターを2

5℃以上に調節した温室に置いてトマトの栽培を行った。

【0055】上記各々のトマト苗について、定植後の地上部について青枯病の発病状況を経時的に観察した。さらに、上記製造例の場合と同様にして観察時の発病程度を判定し、平均発病度を求めた。結果を後述の実施例、比較例の結果と共に表4に示す。

【0056】

【実施例2】 トマト青枯病の防除2

(1) シュードモナス属細菌の菌体懸濁液の調製

上記製造例で得られたシュードモナス プチダ FERM P-15064をPS培地(半合成ポテトシュクロース培地)に接種し、28℃で48時間培養した。培養後、PS培地より菌体をかきとり、これを菌体濃度が 1.0×10^9 cfu/mlになるように脱イオン水に懸濁させて、菌体懸濁液を調製した。

【0057】なお、培養に用いたPS培地(半合成ポテトシュクロース培地)は、1Lの脱イオン水にジャガイモ300gの煎汁液、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を2.0g、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ を0.5g、ペプトン5g、シュクロース15g、寒天15gを加え調整しpHを7に調整した培地であった。

【0058】(2) トマトの栽培

トマト(品種名:桃太郎)の種子を培養土(プロ培土)の苗床に播種し発芽させ、本葉が2~3枚展開した頃に培養土(クレハ園芸培土)を詰めたビニールポットに移植し、25℃以上に調製した温室において育苗した。

【0059】トマト苗の20本について、本葉が7~8枚展開した後、7日毎に芽かきを行い、芽かきによって生じた傷口に上記シュードモナス プチダ FERM P-15064の菌体懸濁液を十分に振りかけて栽培を行った。また、比較のためにこれとは別のトマト苗20本について、上記同様に本葉が7~8枚展開した後、7日毎に芽かきを行い、傷口を何も処理せずに栽培を行った(比較例2)。

【0060】なお上記トマトの栽培において、定植についてはトマト苗の本葉が10~11枚展開した後、上記実施例1と同様にして作製した青枯病菌汚染土壌を詰めたプランターに、プランター1個につき5本ずつ行った。また、定植後も25℃以上に調節した温室にプランターを置いてトマトを栽培した。

【0061】上記各々のトマト苗について、定植後の地上部について青枯病の発病状況を経時的に観察した。さらに、上記製造例の場合と同様にして観察時の発病程度を判定し、平均発病度を求めた。結果を表4に示す。

【0062】

【実施例3~6】 トマト青枯病の防除3

(1) シュードモナス属細菌の菌体懸濁液の調製

シュードモナス プチダ FERM P-15064の菌体懸濁液(菌体濃度 1.0×10^9 cfu/ml)は、上記実施

例2と同様の方法により作製した。また、シュードモナス フルオレセンス FERM P-15063の菌体懸濁液(菌体濃度 1.0×10^9 cfu/ml)は、上記シュードモナス プチダ FERM P-15064の菌体懸濁液の調製において、シュードモナス プチダ FERM P-15064の替わりに、上記製造例で得られたシュードモナス フルオレセンス FERM P-15063を用いた以外は、全く同様の方法で作製された。

【0063】(2) トマトの栽培

10 トマト(品種名:桃太郎)の種子を培養土(プロ培土)の苗床に播種し、発芽させ本葉が2~3枚展開したところに培養土(クレハ園芸培土)を詰めたビニールポットに移植し、25℃以上に調製した温室において育苗した。本葉が7~8枚展開したところで、根に傷をつけるためトマト苗40本をビニールポットから取り出して根を水洗し、このうち20本(実施例3)の苗については傷のついた根部を上記で作製したシュードモナス プチダ FERM P-15064の菌体懸濁液に1時間浸漬後、残りの20本(比較例3)については何も処理せずに、上記実施例1と同様にして作製した青枯病菌汚染土壌10L入りプランターにプランター1個当たり5本ずつ定植した。定植後、25℃以上に調節した温室にプランターを置いてトマトを栽培した。

【0064】また、トマト(品種名:桃太郎)の種子を培養土(プロ培土)の苗床に播種し、発芽させ本葉が2~3枚展開したところで根に傷をつけるため、トマト苗40本の根を水洗し、このうち20本(実施例4)の苗については傷のついた根部を上記で作製したシュードモナス プチダ FERM P-15064の菌体懸濁液に1時間浸漬後、残りの20本(比較例4)については何も処理せずに、培養土(クレハ園芸培土)を詰めたビニールポットに仮植して、25℃以上に調節した温室で育苗した。さらに、本葉が7~8枚展開したところで、ビニールポットから苗を抜き取り、その際に根に生じた傷口を実施例4では上記シュードモナスプチダ FERM P-15064の菌体懸濁液に2時間浸漬した後、比較例4では何も処理せずに、上記実施例1と同様にして作製した青枯病菌汚染土壌10L入りプランターにプランター1個当たり5本ずつ定植した。定植後、25℃以上に調節した温室にプランターを置いてトマトを栽培した。

【0065】さらに、上記実施例3及び実施例4においてシュードモナス プチダ FERM P-15064の菌体懸濁液の替わりに、上記で得られたシュードモナスフルオレセンス FERM P-15063の菌体懸濁液を用いた以外は、それぞれ実施例3、実施例4と同様にトマトの栽培を行い、実施例3に対応する栽培試験を実施例5、実施例4に対応する栽培試験を実施例6とした。

50 【0066】上記各々のトマト苗について、定植後の地

上部について青枯病の発病状況を経時的に観察した。さらに、上記製造例の場合と同様にして観察時の発病程度を判定し、平均発病度を求めた。結果を上記実施例、比

較例の結果と共に表4に示す。

【0067】

【表4】

表4

処理\定植後の経過日数(日)		平均発病度(%)						
		7	14	21	28	35	42	49
シュートモナス プチダ FERM P-15064 による処理	実施例1	0	0	5	10	15	18	20
	実施例2	0	8	13	20	28	—	—
	実施例3	0	14	26	38	51	62	72
	実施例4	0	20	38	52	68	72	78
シュートモナス フルオレセンス FERM P-15063 による処理	実施例5	0	5	5	10	25	38	45
	実施例6	0	5	10	12	20	25	32
無 処 理	比較例1	0	5	12	20	35	55	84
	比較例2	0	24	41	67	92	—	—
	比較例3	30	86	90	95	100	—	—
	比較例4	30	90	90	93	95	—	—

【0068】以上の結果から、シュードモナス プチダ FERM P-15064あるいはシュードモナス フルオレセンス FERM P-15063をトマトの植物組織内部に直接的に導入した実施例のトマトの栽培では、上記シュードモナス属細菌を用いなかった比較例のトマトの栽培に比べ、トマトの青枯病を効果的に防除していることがわかる。また、シュードモナス プチダ FERM P-15064のトマトの植物組織内部への直接的導入を、定植後も定期的に行った実施例1、2のトマトの栽培では、青枯病を効果的かつ継続的に防除していることがわかる。

【0069】

【実施例7】ナス（品種名：千両2号）の種子を培養土（プロ培土）の苗床に播種し、発芽させ、本葉が2～3枚展開した頃に培養土（クレハ園芸培土）を詰めたビニールポットに移植し、25℃以上に調節した温室において7葉期まで育苗した。

【0070】その後、播種から55日目の苗を、上記実施例1と同様にして得られた青枯病菌汚染土壌を詰めたプランター8個にプランター1個当たり5本ずつ定植した。そのうちのプランター4個に定植した苗については、定植の7日前と2日前、及び、定植の7日後、14日後、21日後、28日後に、上記実施例1と同様にしてシュードモナス プチダ FERM P-15064の針接種を行った。残りのプランター4個に定植した苗については、比較のためにシュードモナス属細菌の菌体を付着させていない注射針を上記と同様の時期に同様の方

法で茎の部分に挿入した（比較例5）。なお、定植後も全てのプランターを25℃以上に調節した温室に置いてナスの栽培を行った。

【0071】上記各々のナス苗について、定植後の地上部について青枯病の発病状況を経時的に観察した。さらに、上記製造例の場合と同様にして観察時の発病程度を判定し、平均発病度を求めた。結果を、後述の比較例の結果と共に表5に示す。

【0072】

【実施例8、9】ナス（品種名：千両2号）の種子を培養土（プロ培土）の苗床に播種し、発芽させ、25℃以上に調節した温室において育苗した。本葉が2～3枚展開したところで、根に傷をつけるためにナス苗60本の根を水洗し、このうち20本（実施例8）の苗については傷のついた根部を上記で作製したシュードモナス プチダ FERM P-15064の菌体懸濁液に、別の20本（実施例9）については上記で作製されたシュードモナス フルオレセンス FERM P-15063の菌体懸濁液にそれぞれ1時間浸漬後、残りの20本（比較例6）については何も処理せずに、培養土（クレハ園芸培土）を詰めたビニールポットに仮植して、25℃以上に調節した温室で育苗した。

【0073】さらに、本葉が7～8枚展開したところで、ビニールポットから苗を抜き取り、その際に根に生じた傷口を、実施例8では上記シュードモナス プチダ FERM P-15064の菌体懸濁液に、実施例9においては上記シュードモナスフルオレセンス FERM

P-15063の菌体懸濁液に2時間浸漬した後、比較例6では何も処理せずに、上記実施例1と同様にして作製した青枯病菌汚染土壌10L入りプランターにプランター1個当たり5本ずつ定植した。定植後、25℃以上に調節した温室にプランターを置いてナスを栽培した。

【0074】上記各々のナス苗について、定植後の地上

部について青枯病の発病状況を経時的に観察した。さらに、上記製造例の場合と同様にして観察時の発病程度を判定し、平均発病度を求めた。結果を表5に示す。

【0075】

【表5】

表5

処理\定植後の経過日数(日)		平均発病度(%)				
		7	14	21	28	35
シュドモナス プチダ FERM P-15064 による処理	実施例7	0	5	9	19	25
	実施例8	0	11	19	30	48
シュドモナス フルオレセンス FERM P-15063 による処理	実施例9	0	0	0	6	9
無 処 理	比較例5	0	15	30	68	93
	比較例6	5	48	64	83	100

【0076】以上の結果から、トマトの場合と同様、シュドモナス プチダ FERM P-15064あるいはシュドモナス フルオレセンス FERM P-15063をナスの植物組織内部に直接的に導入した実施例のナスの栽培では、上記シュドモナス属細菌を用いなかった比較例のナスの栽培に比べ、ナスの青枯病を効果的に防除していることがわかる。また、シュドモナス プチダ FERM P-15064のナスの植物組織内部への直接的導入を、定植後も定期的に行った実施例7のナスの栽培では、青枯病を効果的かつ継続的に防除していることがわかる。

【0077】これらの結果から、ナス科植物の植物組織内部にシュドモナス属細菌を直接的に導入する本発明の土壌病害の防除方法によれば、ナス科植物の土壌病害、特に青枯病を、効果的に防除できることがわかる。

【0078】また、本発明の土壌病害防除法は、定植後においてもシュドモナス属細菌を必要に応じて導入することが可能であり、シュドモナス属細菌による処理が定植以前にしか行えない従来の土壌病害防除方法とは異なり、植物の生育段階と無関係に処理が可能であるため、継続して効果的に土壌病害を防除できることがわかる。

【0079】

【発明の効果】本発明のナス科植物の土壌病害防除方法によれば、ナス科植物の栽培において、植物の各生育段階における必要な時期にいつでも、植物の組織内部にシュドモナス属細菌を効率的に定着させることが可能であり、ナス科植物の土壌病害、特に青枯病を継続して効果的に防除することが可能である。